基于 mtDNA 和 rDNA 基因序列的中国按蚊属塞蚊亚属种类的系统发育研究（双翅目：蚊科）

吴　静，马雅军*，马　颖
（第二军医大学病原生物学教研室，上海 200433）

摘要：【目的】应用 mtDNA 和 rDNA 基因特征重建中国按蚊属塞蚊亚属已知种类的系统发育关系，以阐明亚属内各蚊种的亲缘关系。【方法】对采自中国的按蚊属塞蚊亚属 *Anopheles* (*Cellia*) 20 种蚊的 mtDNA-COⅡ和 rDNA-28S-D3 序列进行测定和分析，以按蚊属按蚊亚属 *Anopheles* (*Anopheles*) 的中华按蚊 *An.* (*An.*) *sinensis* 和赫坎按蚊 *An.* (*An.*) *hyrcanus* 为外群，采用 COⅡ和 D3 单基因，以及"COⅡ + D3"联合数据组以邻接法(NJ)、最大简约法(MP)、最大似然法(ML)和贝叶斯法(BI)等重建这些种类的系统发育树。【结果】mtDNA-COⅡ和 rDNA-28S-D3 序列的长度范围分别为 685 bp 和 375 ~ 410 bp，在塞蚊亚属蚊种间的遗传距离分别为 0.015 ~ 0.117 和 0.003 ~ 0.111。各系统树显示外群被合理分开，除在 COⅡ树中新塞蚊系为并系外，各系均聚为单系群，新迈蚊系和迈蚊系亲缘关系最近。联合数据组构建的系统合意树显示中国塞蚊亚属各蚊种形成 4 支，除伪威氏按蚊与多斑按蚊种团未聚为单系群外，其他各种团和复合体成员种均分别聚在一起，各分支的置信值均大于 50%。【结论】本研究获得的分子系统发育树清楚地显示了中国按蚊属塞蚊亚属各种类及系之间的系统发育关系，对其分类和防治研究具有参考价值。

关键词：按蚊属；塞蚊亚属；分子系统学；mtDNA；rDNA；系统发育
中图分类号：Q961　　**文献标识码**：A　　**文章编号**：0454-6296(2010)09-1030-09

Phylogenetic relationship among the species of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae) in China: inferred by mitochondrial and ribosomal DNA sequences

WU Jing, MA Ya-Jun*, MA Ying (Department of Pathogen Biology, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: 【Aim】To reconstruct the phylogeny of the known species of *Anopheles* subgenus *Cellia* from China based on mtDNA-COⅡ and rDNA-28S-D3 sequences, and to interpret the interspecific genetic relationship among them. 【Methods】mtDNA-COⅡ and rDNA-28S-D3 genes of 20 species in subgenus *Cellia* and 2 species in subgenus *Anopheles* of genus *Anopheles* were sequenced and analyzed. The trees of neighbor joining (NJ), maximum parsimony (MP), maximum likelihood (ML) and Bayesian inference (BI) of these species were constructed based on COⅡ, D3 and COⅡ with D3 conjunction dataset, with *Anopheles* (*An.*) *sinensis* and *An.* (*An.*) *hyrcanus* as the outgroup. 【Results】The length range was 685 bp for mtDNA-COⅡ and 375 - 410 bp for rDNA-28S-D3, and the level of pairwise genetic distances among *Cellia* mosquitoes was 0.015 - 0.117 for COⅡ and 0.003 - 0.111 for D3 gene. All the phylogeny trees showed that the outgroup was divergent. The *Neomyzomyia* series was monophyletic, but paraphyletic in COⅡ tree. The relationship between *Myzomyia* and *Neomyzomyia* was close. The 50% consensus tree by COⅡ with D3 conjunction dataset showed that the 20 species in subgenus *Cellia* from China were clustered to 4 major clades, and all members of each series and group were respectively clustered together with above 50% bootstrap value, except *Anopheles* (*Cellia*) *pseudowillmori* not clustered within the *maculatus* group. 【Conclusion】This molecular phylogeny clearly showed the interspecies and inter-series genetic relationship among Chinese subgenus *Cellia* mosquitoes, and could be useful for the taxonomy and control measures.

Key words: *Anopheles*; *Cellia*; molecular phylogenetics; mtDNA; rDNA; phylogeny

---

基金项目：国家自然科学基金委员会-云南省人民政府联合基金(U0932604)；上海市科委基础研究重点项目(No. 08JC1405400)
作者简介：吴静，1983 年生，女，硕士研究生，研究方向为医学昆虫学，E-mail：wujing0801@yahoo.com.cn
*通讯作者 Corresponding author, E-mail：yajunm@yahoo.com.cn
收稿日期 Received：2010-01-29；接受日期 Accepted：2010-07-04

塞蚊亚属 *Cellia* 隶属于双翅目（Diptera），蚊科（Culicidae），按蚊亚科（Anophelinae），按蚊属 *Anopheles*。中国已记录的塞蚊亚属近 30 种（陆宝麟，1997；Harbach and Howard，2007），其中部分种类可以传播严重危害人类健康的疾病。系统发育研究是从蚊虫种群的演化历史和种系发生规律分析环境变迁因子对其生物学特性的制约和影响，是阐明或解释现存蚊类的生态特性和传病关系的重要基础。近年来分子标志的应用推动了该领域研究的进一步发展（Norris，2002；Harbach，2007），在依据核糖体 DNA（Sharpe *et al.*，2000；Garros *et al.*，2005；Torres *et al.*，2006；Hasan *et al.*，2008）或线粒体 DNA（Krzywinski *et al.*，2006；Dusfour *et al.*，2007；Paredes-Esquivel *et al.*，2009）的基因序列重建按蚊属多个种团或复合体系统发育关系的基础上，对塞蚊亚属的系和部分种类的分子系统发育关系已进行了探讨（Sallum *et al.*，2002；Manguin *et al.*，2008；Mohanty *et al.*，2009；Morgan *et al.*，2009）。马雅军等曾对中国赫坎按蚊 *Anopheles hyrcanus* 种团（Ma and Xu，2005）和多斑按蚊 *An. maculatus* 种团（Ma *et al.*，2006）成员种的分子系统发育关系进行了重建。为阐明中国按蚊种间的亲缘关系，并为蚊媒防制策略制定提供重要理论依据，本研究对按蚊属塞蚊亚属部分种类的核糖体 DNA 28S 编码区第 3 结构域（ribosomal DNA 28S coding region third domain，rDNA-28S-D3）和线粒体 DNA 细胞色素氧化酶亚单位Ⅱ（mitochondrial DNA cytochrome oxidase subunit Ⅱ，mtDNA-COⅡ）基因序列进行了测定和分析，并重建其种间的系统发育关系，探讨各分子标志的信息贡献量。

1　材料与方法

1.1　材料

研究所用蚊虫的采集方法为诱蚊灯或人工捕捉成蚊，处死后自然干燥，单头置离心管带回实验室；种类的鉴别依据陆宝麟等（1997）。本研究涉及种类和标本信息如表 1。

1.2　目的基因的扩增和测序

按 Collins 等（1987）的方法，提取单蚊基因组 DNA。扩增 mtDNA-COⅡ和 rDNA-28S-D3 基因的引物参照文献设计、合成（Beard *et al.*，1993；Sharpe *et al.*，2000）（表 2），反应体系相同，均含 2 μL DNA 模板、1×PCR 缓冲液、0.1 mmol/L dNTPs、1.7 mmol/L $MgCl_2$、2.0 U DNA *Taq* 聚合酶和 0.1 μmol/L 成对引物。反应条件为 94℃ 2 min 后，以 94℃ 30 s、45℃ 1 min、72℃ 1 min 共 39 个循环，72℃延伸8 min。扩增产物经 1% 琼脂糖（含 5‰ Goldview）凝胶电泳检测后，割胶回收 PCR 产物，四色荧光标记的双脱氧链终止法测序（ABI 3730 测序仪，上海英骏生物技术有限公司），测序引物同扩增引物，采用正、反向测序以保证序列的完整性。

表 2　扩增 mtDNA-COⅡ和 rDNA-28S-D3 的引物序列
Table 2　Primers for mtDNA-COⅡ and rDNA-28S-D3 amplification

目的基因 Gene	引物序列（5′→3′）Primer sequences
mtDNA-COⅡ	Forward：TCTAATATGGCAGATTAGTGCA
	Reverse：ACTTGCTTTCAGTCATCTAATG
rDNA-28S-D3	Forward：GACCCGTCTTGAAACACGGA
	Reverse：TCGGAAGGAACCAGCTACTA

1.3　数据统计与分析

测序结果以 Bioedit 5.0.9 软件包进行核对，必要时手工调整，确保序列的准确性。采用 Clustal X 1.8 比对所获序列，参数为默认值，将比对结果输入 MEGA 3.1 软件包进行序列组成分析，包括变异位点（variable sites）、简约信息位点（parsimony information sites）和碱基组成（nucleotide composition）等，依据无脊椎动物的线粒体密码子在 MEGA 中推测氨基酸序列，并计算各蚊种间的未矫正 *P* 遗传距离。

在 PAUP 4.0b10 和 MrBayes V3.1 软件包中进行系统发育分析。分别采用邻接法（neighbor joining，NJ）、最大简约法（maximum parsimony，MP）和最大似然法（maximum likelihood，ML）在 PAUP 中构建系统树。构建 ML 树之前，应用 Modeltest 3.06 软件包选择其最优进化模型。应用 MrBayes 构建贝叶斯（Bayesian inference，BI）树，以随机树为起始树，同时运行 4 个马尔可夫链（Markov Chain Monte Carlo，MCMC），共运行150 000代，每 10 代抽样 1 次，用似然值达到饱和之后的数据获得贝叶斯树。对上述 4 种方法构建的系统树在 PAUP 中进行 SH 检验（Shimodaira-Hasegawa test），检验各树的拓扑结构差异是否显著，对差异不显著的系统树构建 50% 合意树。

本研究进行系统发育分析时分别依据各单基因数据和基因联合数据组，在分析前对联合数据组进行 ILD 检验（incongruence length difference test），检验联合分析的数据是否具有相合性。

表 1 本研究所用按蚊的种类信息

Table 1 Data of Anopheline mosquitoes in this study

类群* Taxonomical group	种名 Species	采集地 Collecting locality	采集时间 Collecting date	个体数 Number of individuals	GenBank 登录号 GenBank submission no. mtDNA-COⅡ	rDNA-28S-D3
塞蚊亚属 Subgenus *Cellia*						
迈蚊系 *Myzomyia* series						
催命按蚊种团 *funestus* group						
乌头按蚊亚群 *aconitus* subgroup	乌头按蚊 *An. aconitus*	云南江城 Jiangchen, Yunnan	2005.08	4	EU620672	EU570055
库态按蚊亚群 *culicifacies* subgroup	库态按蚊 *An. culicifacies*	四川昭觉 Zhaojue, Sichuan	1997.06	2	AY949850	EU650420
微小按蚊亚群 *minimus* subgroup	微小按蚊 *An. minimus*[1]	海南崖县 Yaxian, Hainan	1995.08	4	AY953366	AY737083
	哈里森按蚊 *An. harrisoni*[2]	云南勐腊 Mengla, Yunnan	1996.10	4	AY953362	AY737084
新迈蚊系 *Neomyzomyia* series						
腹簇按蚊种团 *kochi* group	腹簇按蚊 *An. kochi*	云南江城 Jiangchen, Yunnan	2005.08	3	EU620676	EU570056
大劣按蚊复合体 *dirus* complex	大劣按蚊 *An. dirus*[3]	海南毛阳 Maoyang, Hainan 柬埔寨 Kampong Spoe, Cambodia	1995.07 2003.01	2 2	AY948341	AY737092
	大劣按蚊 D *An. dirus* D	云南江城 Jiangchen, Yunnan 云南勐腊 Mengla, Yunnan	2005.08 2005.08	2 2	AY948343	DQ629907
棋斑按蚊种团 *tessellatus* group	棋斑按蚊 *An. tessellates*	云南江城 Jiangchen, Yunnan	2005.08	3	EU620674	EU570057
新塞蚊系 *Neocellia* series						
	帕氏按蚊 *An. pattoni*	陕西宁陕 Ningshan, Shaanxi	2005.07	5	EU620677	EU570060
	斯氏按蚊 *An. stephensi*[4]	实验室品系 Hor 株 Laboratory colony, strain Hor	–	4	AY949851	GU479450
环纹按蚊种团 *annularis group*	环纹按蚊 *An. annularis*	云南江城 Jiangchen, Yunnan	2005.08	4	EU620675	EU570058
	雪足按蚊 *An. nivipes*	云南江城 Jiangchen, Yunnan	2005.08	3	EU620673	EU570059
	菲律宾按蚊 *An. philippinensis*	云南勐腊 Mengla, Yunnan	2009.10	3	GU373721	GU373720
多斑按蚊种团 *maculatus* group	伪威氏按蚊 *An. pseudowillmori*	云南勐腊 Mengla, Yunnan	1995.08	4	AF448476	AY120846
	威氏按蚊 *An. willmori*	云南勐腊 Mengla, Yunnan	2001.08	3	AF448471	AY120848
多斑按蚊亚群 *maculatus* subgroup	多斑按蚊 *An. maculatus*	海南琼中 Qiongzhong, Hainan 云南勐腊 Mengla, Yunnan	1995.08 2001.08	1 2	AF448470	AY120851
	达罗毗按蚊 *An. dravidicus*	云南勐腊 Mengla, Yunnan 四川凉山 Liangshan, Sichuan	1995.08 1995.08	2 2	AF448475	AY161318
塞沃按蚊亚群 *sawadwongporni* subgroup	塞沃按蚊 *An. sawadwongporni*	云南勐腊 Mengla, Yunnan	2001.08	2	AF448473	AY737086
詹氏按蚊种团 *jamesii* group	美彩按蚊 *An. splendidus*	云南江城 Jiangchen, Yunnan	2005.08	4	GQ150161	EU570063
带热蚊系 *Pyretophorus* series						
	迷走按蚊 *An. vagus*	云南江城 Jiangchen, Yunnan	2001.08	6	FJ457635	EU570062
按蚊亚属 Subgenus *Anopheles*						
	中华按蚊 *An. sinensis*	山东济宁 Jining, Shandong	2004.07	4	AY953144	AY803802
	赫坎按蚊 *An. hyrcanus*	新疆伊宁 Yining, Xingjiang	1999.08	4	GQ494008	AY376903

* 类群划分参照 Harbach(2004)。[1]微小按蚊 A 的同物异名(Harbach *et al*., 2007); [2]微小按蚊 C 的同物异名(Harbach *et al*., 2007); [3]大劣按蚊 A 的同物异名(Sallum *et al*., 2005); [4]实验室品系的采集地和采集时间不详。* Classification based on the Harbach (2004). [1] The synonym of *An. minimus* A (Harbach *et al*., 2007); [2] The synonym of *An. minimus* C (Harbach *et al*., 2007); [3] The synonym of *An. dirus* A (Sallum *et al*., 2005). [4] The collecting site and date of the laboratory colony were unclear.

2　结果

2.1　基因特征

本研究获得22 种按蚊的 mtDNA-COⅡ和 rDNA-28S-D3 序列，包括按蚊属塞蚊亚属的 20 种，以及外群按蚊亚属的中华按蚊和赫坎按蚊。两种基因特征如下。

2.1.1　mtDNA-COⅡ：对本研究中 22 种按蚊的 mtDNA-COⅡ序列进行比对，结果显示 mtDNA-COⅡ全长为 685 bp，为一个完整的阅读框，编码由 228 个氨基酸残基组成的 COⅡ，其起始密码子为 ATG，以一个 T 作为潜在的终止密码子，未发现碱基的插入和缺失。

在 685 个比对位点中内群 20 种存在 191 个变异位点，150 个简约信息位点，A + T 平均含量为 74.4%。在密码子的不同位置，碱基组成差异较大，其中 AT 含量在第 3 位为 92.7%，高于第 1 位的63.6% 和第 2 位的 66.8%。228 个氨基酸残基比对的结果显示，保守位点 214 个，占 93.86%；变异位点 14 个，为 6.14%。

各蚊种间的遗传距离显示，内群与外群间范围为 0.088 ~0.115，内群蚊种间为 0.015 ~0.117，其中大劣按蚊与大劣按蚊 D 之间的核苷酸变异最小，大劣按蚊与塞沃按蚊间变异最大(表 3)。

2.1.2　rDNA-28S-D3：本研究 22 种按蚊的 rDNA-28S-D3 序列长度范围为 375 ~410 bp，校对排齐后显示，内群中核苷酸对比位点共 446 个，其中变异位点 165 个，简约信息位点 135 个，T，C，A 和 G 的平均含量为 18.7%，27.7%，23.2% 和 30.4%。

各蚊种间遗传距离的计算结果显示，内群与外群间范围为 0.108 ~0.149，内群种类间的核苷酸变异范围为 0.003 ~0.111，其中大劣按蚊与大劣按蚊 D、多斑按蚊与达罗毗按蚊间序列变异最小；腹簇按蚊与伪威氏按蚊间变异最大(表 3)。

2.1.3　“COⅡ + D3”联合数据组

本研究对获得的 COⅡ和 D3 数据进行组合，连接后得到“COⅡ + D3”联合数据组，该组的核苷酸比对位点共 1 129 个，其中变异位点 369 个，简约信息位点 298 个。对“COⅡ + D3”联合数据组的数据进行 ILD 检验，结果显示两组数据具有不相合性($P = 0.001$)。

2.2　系统发育树

本研究分别依据 COⅡ，D3 和“COⅡ + D3”联合数据组，采用 MP 法、NJ 法、ML 法和 BI 法构建系统发育树。应用 Modeltest 对上述 3 组数据的序列比对结果分别进行等级似然比检验，结果显示最适合的 DNA 进化模型均为 GTR + I + G 模型。

2.2.1　mtDNA-COⅡ：以中华按蚊和赫坎按蚊为外群，依据 COⅡ单基因序列构建了 4 种系统发育树，SH 检验的结果显示 ML 树似然值最小，且与 MP 树、NJ 树和 BI 树的似然值差异显著($P < 0.05$)，提示 ML 树能较好解释 COⅡ数据，显示外群被合理分开，内群形成 5 小支(图 1)。

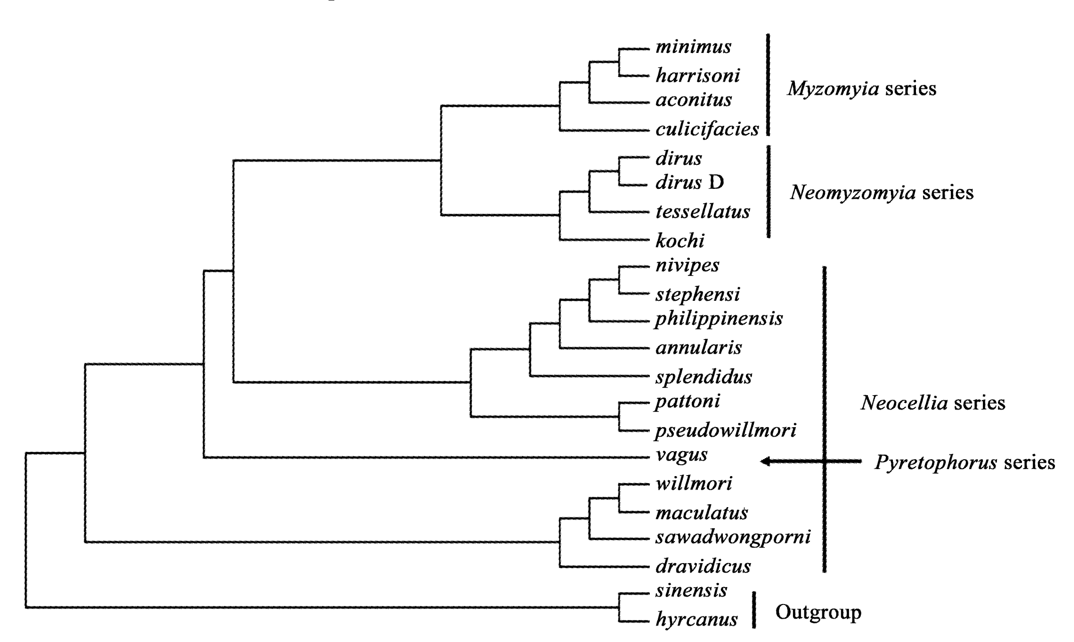


图 1　依据 mtDNA-COⅡ序列构建的塞蚊亚属 ML 树(GTR + I + G 模型)

Fig. 1　The ML tree of Subgenus *Cellia* mosquitoes by mtDNA-COⅡ dataset (GTR + I + G model)

表 3 本研究塞蚊亚属和外群成对蚊种间的 COII 基因(下三角)和 D3 基因(上三角)遗传距离

Table 3 Pairwise estimates of genetic distances for COII gene (blow the diagonal) and D3 gene (above the diagonal) among mosquito species in subgenus *Cellia* and outgroups

	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]	[12]	[13]	[14]	[15]	[16]	[17]	[18]	[19]	[20]	[21]	[22]
[1]		0.069	0.072	0.075	0.085	0.079	0.085	0.086	0.095	0.089	0.089	0.091	0.095	0.102	0.104	0.092	0.096	0.091	0.094	0.088	0.099	0.101
[2]	0.022		0.069	0.066	0.080	0.094	0.089	0.083	0.108	0.091	0.099	0.079	0.099	0.098	0.098	0.088	0.091	0.095	0.096	0.096	0.091	0.089
[3]	0.022	0.031		0.015	0.094	0.098	0.099	0.099	0.113	0.102	0.107	0.094	0.092	0.113	0.117	0.107	0.113	0.098	0.107	0.102	0.114	0.107
[4]	0.025	0.034	0.003		0.099	0.098	0.102	0.099	0.113	0.104	0.104	0.095	0.091	0.111	0.111	0.107	0.113	0.102	0.107	0.101	0.110	0.105
[5]	0.111	0.105	0.111	0.115		0.072	0.057	0.057	0.101	0.085	0.091	0.085	0.104	0.098	0.102	0.083	0.088	0.095	0.096	0.091	0.098	0.091
[6]	0.093	0.087	0.093	0.096	0.025		0.058	0.066	0.104	0.088	0.091	0.083	0.091	0.102	0.104	0.079	0.095	0.092	0.098	0.094	0.091	0.095
[7]	0.096	0.090	0.096	0.099	0.028	0.031		0.047	0.105	0.096	0.101	0.089	0.094	0.108	0.111	0.079	0.096	0.099	0.096	0.094	0.088	0.091
[8]	0.105	0.099	0.099	0.102	0.031	0.034	0.009		0.107	0.099	0.104	0.092	0.105	0.108	0.118	0.095	0.092	0.102	0.107	0.102	0.092	0.094
[9]	0.099	0.093	0.093	0.096	0.071	0.053	0.059	0.062		0.098	0.096	0.105	0.102	0.114	0.111	0.099	0.113	0.113	0.098	0.102	0.114	0.111
[10]	0.099	0.093	0.096	0.099	0.084	0.068	0.084	0.090	0.080		0.038	0.088	0.086	0.044	0.051	0.075	0.088	0.088	0.086	0.077	0.091	0.088
[11]	0.099	0.093	0.096	0.099	0.084	0.068	0.084	0.090	0.080	0.003		0.099	0.092	0.038	0.051	0.075	0.094	0.094	0.088	0.079	0.098	0.095
[12]	0.102	0.096	0.102	0.105	0.068	0.053	0.074	0.074	0.077	0.022	0.025		0.077	0.104	0.098	0.077	0.085	0.085	0.083	0.083	0.091	0.095
[13]	0.111	0.105	0.105	0.108	0.077	0.062	0.077	0.084	0.074	0.022	0.025	0.015		0.102	0.095	0.080	0.094	0.092	0.098	0.085	0.095	0.094
[14]	0.099	0.093	0.093	0.096	0.077	0.062	0.077	0.080	0.074	0.009	0.012	0.019	0.019		0.057	0.085	0.102	0.094	0.099	0.088	0.108	0.107
[15]	0.093	0.084	0.093	0.096	0.071	0.062	0.071	0.080	0.065	0.022	0.025	0.037	0.037	0.022		0.079	0.111	0.099	0.099	0.088	0.101	0.094
[16]	0.108	0.102	0.096	0.099	0.080	0.068	0.080	0.080	0.074	0.028	0.031	0.028	0.037	0.031	0.046		0.060	0.080	0.073	0.072	0.091	0.094
[17]	0.105	0.099	0.093	0.096	0.084	0.068	0.087	0.090	0.080	0.028	0.031	0.025	0.031	0.025	0.040	0.015		0.086	0.089	0.085	0.096	0.098
[18]	0.105	0.099	0.093	0.096	0.084	0.068	0.087	0.090	0.077	0.022	0.025	0.025	0.028	0.019	0.034	0.015	0.009		0.086	0.085	0.091	0.089
[19]	0.096	0.090	0.087	0.090	0.074	0.059	0.074	0.077	0.065	0.028	0.031	0.022	0.031	0.022	0.034	0.012	0.015	0.015		0.079	0.108	0.115
[20]	0.108	0.102	0.102	0.105	0.074	0.062	0.074	0.071	0.071	0.028	0.031	0.037	0.037	0.019	0.028	0.040	0.040	0.034	0.037		0.089	0.092
[21]	0.127	0.124	0.124	0.127	0.115	0.111	0.108	0.115	0.118	0.130	0.130	0.121	0.127	0.124	0.127	0.133	0.124	0.121	0.121	0.127		0.038
[22]	0.142	0.133	0.139	0.142	0.124	0.121	0.127	0.133	0.127	0.139	0.139	0.133	0.139	0.133	0.133	0.149	0.142	0.133	0.136	0.142	0.050	

[1] *An. kochi*; [2] *An. tessellatus*; [3] *An. dirus*; [4] *An. dirus* D; [5] *An. aconitus*; [6] *An. culicifacies*; [7] *An. minimus*; [8] *An. harrisoni*; [9] *An. vagus*; [10] *An. maculatus*; [11] *An. dravidicus*; [12] *An. pattoni*; [13] *An. pseudowillmori*; [14] *An. willmori*; [15] *An. sawadwongporni*; [16] *An. nivipes*; [17] *An. philippinensis*; [18] *An. splendidus*; [19] *An. annularis*; [20] *An. stephensi*; [21] *An. sinensis*; [22] *An. hyrcanus*.

2.2.2　rDNA-28S-D3：本研究对依据 D3 单基因数据构建的 4 种系统发育树进行 SH 检验，结果显示 BI 树似然值最小，与 MP 树的似然值差异显著（$P<0.05$），与 NJ 树和 ML 树的差异不显著（$P>0.05$），提示 NJ，ML 和 BI 树都能较好解释 D3 数据，保留三者共同的分支，建立 50% 合意树（图 2）。合意树显示外群种类与内群分开，内群种类形成 4 支，NJ 树各分支的置信值大于 58%，BI 树的后验概率在 0.85以上。

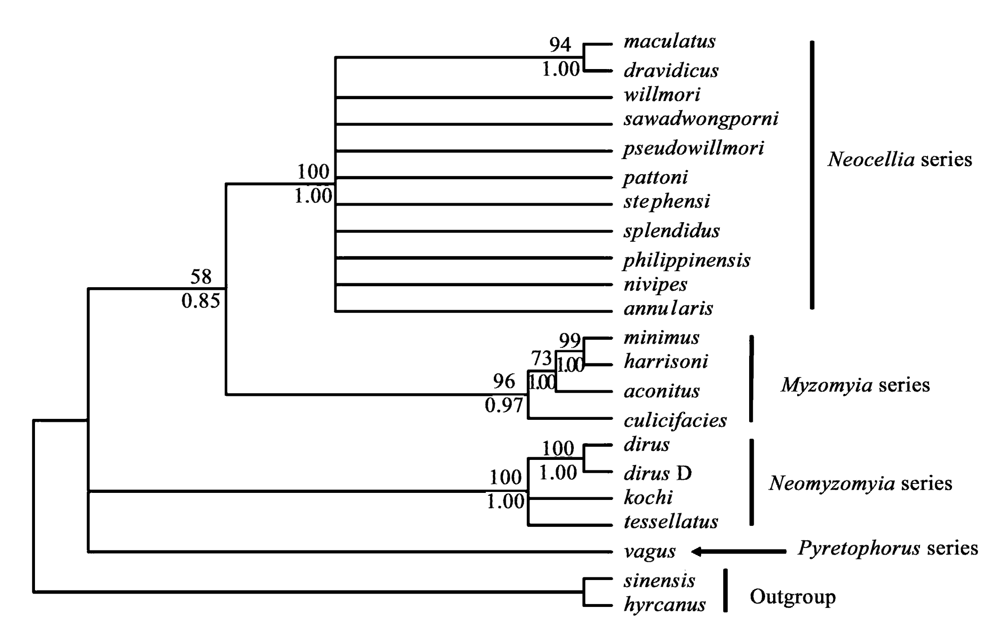


图 2　依据 rDNA-28S-D3 序列构建的塞蚊亚属 NJ，ML 与 BI 的 50% 合意树

Fig. 2　The 50% consensus tree (NJ, ML and BI) of Subgenus *Cellia* mosquitoes by rDNA-28S-D3 dataset

分支之上数据为 NJ 树的置信值，之下为 BI 树的后验概率。NJ bootstrap and BI posterior probability values are shown above and below each node, respectively.

2.2.3　“COⅡ + D3”联合数据组：对依据“COⅡ + D3”数据组构建的塞蚊亚属 ML 树似然值最小，与 BI 树的似然值差异显著（$P<0.05$），与 NJ 树和 MP 树差异不显著（$P>0.05$），提示 NJ，MP 和 ML 树都能较好解释联合数据组，故建立 50% 合意树（图3）。合意树显示外群被合理分开，内群种类形成4 支：①新塞蚊系 11 种：（（威氏按蚊，塞沃按蚊，多斑按蚊，达罗毗按蚊）（帕氏按蚊，伪威氏按蚊）（雪足按蚊，菲律宾按蚊）环纹按蚊，斯氏按蚊，美彩按蚊）；②新迈蚊系 4 种：（（大劣按蚊，大劣按蚊 D）腹簇按蚊，棋斑按蚊）；③迈蚊系 4 种：（（（微小按蚊，哈里森按蚊）乌头按蚊）库态按蚊）；④带热蚊系：迷走按蚊。NJ 树和 MP 树的置信值显示外群与内群分离支持度高，内群中分支②和③置信值均大于 96%，但分支①中有的小于 50%。

3　讨论

本研究重建中国塞蚊亚属蚊种的系统发育关系依据的分子特征包括线粒体和核糖体 DNA 的基因序列，虽然 COⅡ和 D3 基因序列突变频率不同，D3 比 COⅡ保守，但在本研究的蚊种中均显示出良好的种特异性，与文献报告的在其他蚊种中的应用一致（Sallum *et al.*，2002；Mohanty *et al.*，2009；Morgan *et al.*，2009），应是重建塞蚊亚属蚊系统发育关系理想的分子标志。但值得注意的是，作者在研究中发现 COⅡ基因序列在按蚊种内存在一定程度的差异，但小于种间差异（本组未发表资料），故在分析按蚊隐种间的关系时，需特别谨慎。理论上联合多个分子标志分析可获得更为符合实际的系统发育树，其原因是信息量更大。但由于不同的基因具有相异的进化速率，故在联合分析之前，须进行数据的不相合性检验，而对于检验结果为不相合性时，是否还可进行联合分析，各学者持不同观点（Bull *et al.*，1993；Nixon and Carpenter，1996；DeSalle and Brower，1997；田颖和卜文俊，2007）。作者将 COⅡ与 D3 联合分析时，ILD 检验虽显示不具相合性，但依据该数据组重建的系统发育树却具

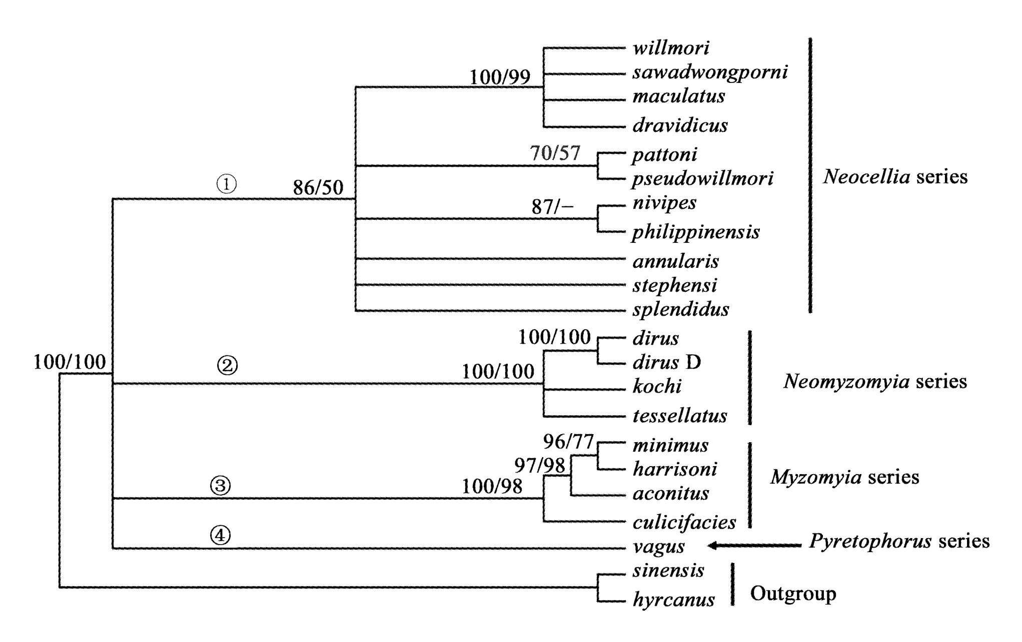


图 3 依据“COⅡ + D3”联合数据组构建的塞蚊亚属 NJ，MP 与 ML 的 50% 合意树

Fig. 3 The 50% consensus tree (NJ, ML and MP) of subgenus *Cellia* mosquitoes by COⅡ with D3 conjunction dataset

分支上数字为 NJ 树和 MP 树的置信值。NJ and MP bootstrap values are above each node.

有相当的合理性。因此，应综合考虑检验结果、系统树的拓扑结构，以及其他特征(如形态特征、生态习性和传病作用等)判断联合分析的可行性。

依据形态特征研究按蚊属塞蚊亚属蚊种的系统发育关系研究多有报告(Foley *et al.*, 1998; Sallum *et al.*, 2000; Harbach and Kitching, 2005)，主要的类群划分已基本达成共识。而依据分子特征的相关研究目前针对系、种团和复合体成员种的较多，如：多斑按蚊种团(Ma *et al.*, 2006; Walton *et al.*, 2007)，催命按蚊种团和微小按蚊种团(Sharpe *et al.*, 2000; Garros *et al.*, 2005)，圣代可按蚊 *An. sundaicus* 复合体(Dusfour *et al.*, 2007)以及新塞蚊系等(Morgan *et al.*, 2009)等，所及的种类和数量均有限，无法全面甄别塞蚊亚属的系统发育关系。印度学者应用分子特征构建了该国塞蚊亚属部分优势种系统发育关系，以澄清形态近似种间关系(Mohanty *et al.*, 2009)。本研究涉及中国塞蚊亚属蚊类有 20 种，具有较强的代表性，有助于评价现存的按蚊分类系统，为进一步全面阐明蚊科的种间亲缘关系奠定了重要基础。本研究重建的中国塞蚊亚属系间关系显示，新迈蚊系和迈蚊系均为单系，其间亲缘关系近，各分子特征结果相互支持；带热蚊系中仅 1 种，其位置不稳定，正确与否难以判断；新塞蚊系在依据 COⅡ序列构建的系统树中为并系，在 D3 序列和联合数据组中却为单系，但后者的置信度偏低。Foley 等(1998)和 Morgan 等(2009)也支持新塞蚊系为并系，但各自依据的分子特征和蚊种不同，故新塞蚊系是否存在分化需增加种类进一步确定。

蚊种的准确鉴别是建立系统发育关系的关键，塞蚊亚属中有些蚊种的形态变异较大，尤其是种团和复合体隐种。为避免由分类带来的误差，本研究每种均应用多个个体，反复比较和核对，并删去了一些无法确定种特异序列的种类，如：杰普尔按蚊 *An. jeyporiensis*，伪詹氏按蚊 *An. pseudojamesi*(同物异名：阔鳞按蚊 *An. ramsayi*)和无定按蚊 *An. indefinitus* 等。重建的中国塞蚊亚属种间系统发育关系显示，大劣按蚊复合体和微小按蚊亚群的 2 种亲缘关系均为最近，乌头按蚊与库态按蚊聚类位置稳定。库态按蚊在印度为复合体，存在 5 个隐种，且在不同地区传疟作用存在差异，D3 序列比对结果显示中国分布的应为 B/C/E 种(Singh *et al.*, 2004)，但比对了核糖体 DNA 第二内转录间隔区序列后(本组未发表资料)，发现与库态按蚊 B 种的碱基无差异(Manonmani *et al.*, 2007)。新塞蚊系的多斑按蚊种团在中国分布有 5 种，拓扑结构均显示除伪威氏按蚊外的其他 4 种为单系，伪威氏按蚊与之的亲缘关系均为最远，且不在一个分支，提示伪威氏按蚊应重新归类，支持早前的观点(Ma *et al.*, 2006; Walton *et al.*, 2007)。本研究涉及的环纹按

蚊种团有 3 成员种未聚为 1 支，但依据联合数据组显示 3 成员种间关系相近，菲律宾按蚊与雪足按蚊的亲缘关系最近，两蚊在形态上也较难区分。有学者报告环纹按蚊在印度存在 2 个隐种(Tauqeer *et al.*, 2007)，D3 序列比对结果显示中国分布的应为 A 种(相差 1 个碱基)。腹簇按蚊与棋斑按蚊在新迈蚊系中，以及斯氏按蚊、帕氏按蚊和美彩按蚊在新塞蚊系中的聚类位置不稳定，其原因可能是各自种团内其他成员种较少所致。

迄今，许多蚊种的基因组计划已经完成或正在进行，海量的基因序列信息不断被发表，对海量基因序列信息在系统发育方面的深入应用形成了全新的学科——系统发育基因组学(phylogenomics)。已有的研究证明系统发育基因组学在解决一些生物进化的基本问题方面有巨大潜力(Delsuc *et al.*, 2005)，应用系统发育基因组学重建蚊种的系统发育关系应是未来研究的重要方向。

致谢　承蒙云南省寄生虫病防治所顾云安和王丕玉及第二军医大学杨曼尼和李翔宇等协助采集样本，在此表示诚挚的谢意！

参 考 文 献(References)

Beard CB, Hamm DM, Collins FH, 1993. The mitochondrial genome of the mosquito *Anopheles gambiae*: DNA sequence, genome organization, and comparisons with mitochondrial sequences of other insects. *Insect Mol. Biol.*, 2(2): 103－124.

Bull JJ, Huelsenbeck JP, Cunningham CW, Swofford DL, Waddell PJ, 1993. Partitioning and combining data in phylogenetic analysis. *Syst. Biol.*, 42(3): 384－397.

Collins FH, Mendez MA, Rasmussen MO, Mehaffey PC, Besansky NJ, Finnerty V, 1987. A ribosomal RNA gene probe differentiates member species of the *Anopheles gambiae* complex. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 37(1): 37－41.

Delsuc F, Brinkmann H, Philippe H, 2005. Phylogenomics and the reconstruction of the tree of life. *Nat. Genet.*, 6(5): 361－374.

DeSalle R, Brower AVZ, 1997. Process portions, congruence and the independence of characters: inferring relationships among closely related Hawaiian *Drosophila* from multiple gene regions. *Syst. Biol.*, 46(4): 751－764.

Dusfour I, Michaux JR, Harbach RE, Manguin S, 2007. Speciation and phylogeography of the Southeast Asian *Anopheles sundaicus* complex. *Infect. Genet. Evol.*, 7(4): 484－493.

Foley DH, Bryan JH, Yeates D, Saul A, 1998. Evolution and systematics of *Anopheles*: insights from a molecular phylogeny of Australasian mosquitoes. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 9(2): 262－275.

Garros C, Harbach RE, Manguin S, 2005. Systematics and biogeographical implications of the phylogenetic relationships between members of the *funestus* and *minimus* groups of *Anopheles* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.*, 42(1): 7－18.

Harbach RE, 2004. The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull. Entomol. Res.*, 946: 537－553.

Harbach RE, 2007. The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa*, 1668: 591－638.

Harbach RE, Garros C, Manh ND, Manguin S, 2007. Formal taxonomy of species C of the *Anopheles minimus* sibling species complex (Diptera: Culicidae). *Zootaxa*, 1654: 41－54.

Harbach RE, Howard TM, 2007. Index of currently recognized mosquito species (Diptera: Culicidae). *Eur. Mosq. Bull.*, 23: 1－66.

Harbach RE, Kitching LJ, 2005. Reconsideration of anopheline mosquito phylogeny (Diptera: Culicidae: Anophelinae) based on morphological data. *Syst. Biodivers.*, 3(4): 345－374.

Hasan AU, Suguri S, Fujimoto C, Itaki RL, Harada M, Kawabata M, Bugoro H, Albino B, 2008. Genetic diversity in two sibling species of the *Anopheles punctulatus* group of mosquitoes on Guadalcanal in the Solomon Islands. *BMC Evol. Biol.*, 8: 318.

Krzywinski J, Grushko OG, Besansky NJ, 2006. Analysis of the complete mitochondrial DNA from *Anopheles funestus*: an improved dipterans mitochondrial genome annotation and a temporal dimension of mosquito evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 39(2): 417－423.

Lu BL *et al.*, 1997. Fauna Sinica, Insecta. Vol. 9 Diptera: Culicidae II. Science Press, Beijing. 190 pp. [陆宝麟等编著, 1997. 中国动物志 昆虫纲 第九卷 双翅目 蚊科(下卷). 北京: 科学出版社. 190 页]

Ma YJ, Li SZ, Xu JN, 2006. Molecular identification and phylogeny of the *maculatus* group of *Anopheles* mosquitoes (Diptera: Culicidae) on the basis of nuclear and mitochondrial DNA sequences. *Acta Trop.*, 99(2－3): 272－280.

Ma YJ, Xu JN, 2005. The *hyrcanus* group of *Anopheles* (*Anopheles*) in China (Diptera: Culicidae): species discrimination and phylogenetic relationships inferred by ribosomal DNA internal transcribed spacer 2 sequences. *J. Med. Entomol.*, 42(4): 610－619.

Manguin S, Garros C, Dusfour I, Harbach RE, Coosemans M, 2008. Bionomics, taxonomy, and distribution of the major malaria vector taxa of *Anopheles* subgenus *Cellia* in Southeast Asia: an updated review. *Infect. Genet. Evol.*, 8: 489－503.

Manonmani AM, Sadanandane C, Sahu SS, Mathivanan A, Jambulingam P, 2007. rDNA-ITS2-PCR assay for grouping the cryptic species of *Anopheles culicifacies* complex (Diptera: Culicidae). *Acta Trop.*, 104(1): 72－77.

Mohanty A, Swain S, Kar SK, Hazra RK, 2009. Analysis of the phylogenetic relationship of *Anopheles* species, subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae) and using it to define the relationship of morphologically similar species. *Infect. Genet. Evol.*, 9(6): 1204－1224.

Morgan K, O'Loughlin SM, Mun-Yik F, Linton YM, Somboon P, Min S, Htun PT, Nambanya S, Weerasinghe I, Sochantha T, Prakash

A, Walton C, 2009. Molecular phylogenetics and biogeography of the *Neocellia* series of *Anopheles* mosquitoes in the Oriental Region. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 52(3): 588 – 601.

Nixon KC, Carpenter JM, 1996. On simultaneous analysis. *Cladistics*, 12: 221 – 241.

Norris DE, 2002. Genetic markers for study of the anopheline vectors of human malaria. *Int. J. Parasitol.*, 32(13): 1607 – 1615.

Paredes-Esquivel C, Donnelly MJ, Harbach RE, Townson H, 2009. A molecular phylogeny of mosquitoes in the *Anopheles barbirostris* subgroup reveals cryptic species: implications for identification of disease vectors. *Mol. Phylogenet. Evol.*, 50(1): 141 – 151.

Sallum MAM, Peyton EL, Wilkerson RC, 2005. Six new species of the *Anopheles leucosphyrus* group, reinterpretation of the *Anopheles elegans* and vector implications. *Med. Vet. Entomol.*, 19(2): 158 – 199.

Sallum MAM, Schultz TR, Poster PC, Writz RA, Wilkerson RC, 2002. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on nuclear ribosomal and mitochondrial DNA sequences. *Syst. Entomol.*, 27(3): 361 – 781.

Sallum MAM, Schultz TR, Wilkerson RC, 2000. Phylogeny of Anophelinae (Diptera: Culicidae) based on morphological characters. *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 93(4): 745 – 775.

Sharpe RG, Harbach RE, Butlin RK, 2000. Molecular variation and phylogeny of members of the *minimus* group of *Anopheles* subgenus *Cellia* (Diptera: Culicidae). *Syst. Entomol.*, 25(2): 263 – 272.

Singh OP, Goswami G, Nanda N, Raghavendra K, Chandra D, Subbarao SK, 2004. An allele-specific polymerase chain reaction assay for the differentiation of members of the *Anopheles culicifacies* complex. *J. Biosci.*, 29(3): 275 – 280.

Tauqeer MA, Das MK, Dev V, Ansari MA, Sharma YD, 2007. Identification of two cryptic species in the *Anopheles* (*Cellia*) *annularis* complex using ribosomal DNA PCR-RFLP. *Parasitol. Res.*, 100(5): 943 – 948.

Tian Y, Bu WJ, 2007. Testing character incongruence in phylogenetic reconstruction insect molecular sysmatic. *Acta Zootaxonomica Sinica*, 32(2): 363 – 368. [田颖, 卜文俊, 2007. 系统发育分析中检测数据不相合性的方法. 动物分类学报, 32(2): 363 – 368]

Torres EP, Foley DH, Bryan JH, 2006. Molecular systematics of the Philippine malaria vector *Anopheles flavirostris*. *Med. Vet. Entomol.*, 20(1): 44 – 52.

Walton C, Somboon P, O′Loughlin SM, Zhang S, Harbach RE, Linton YM, Chen B, Nolan K, Duong S, Fong MY, Vythilingum I, Mohammed ZD, Trung HT, Butlin RK, 2007. Genetic diversity and molecular identification of mosquito species in the *Anopheles maculatus* group using the ITS2 region of rDNA. *Infect. Genet. Evol.*, 7(1): 93 – 102.

(责任编辑: 袁德成)